Physiologisch-chemische Untersuchungen in der Kohlenhydratreihe

Teil I.

Über den Verlauf der alkoholischen Gärung bei Gegenwart von kohlensaurem Kalk

Teil II.

Über eine Verbindung der Stärke mit Phosphorsäure

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

genehmigt von der

Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Dr. phil. **Johannes Kerb**

Arzt aus Berlin

Tag der Promotion: ~~29.~~ 23. Juli 1919

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

136

Dekan: Professor Dr. His

Referent: Professor Dr. von Wassermann

Korreferent: Professor Dr. His

Meiner Frau

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546509_0136

Sonderabdruck aus der Biochemischen Zeitschr. Band 100.

Über eine Verbindung der Stärke mit Phosphorsäure.

Von

Johannes Kerb.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlen.)

(Eingegangen am 26. Juni 1919.)

Einzelne Elemente haben dadurch eine besondere biologische Bedeutung, daß sie in der Natur in organischer Bindungsform auftreten. Zu den wenigen Grundstoffen dieser Art gehört der Phosphor, der in Gestalt der Phosphorsäure sich am Aufbau zahlreicher wichtiger Bausteine der Lebewesen beteiligt. Phosphorhaltige Lipoide oder Phosphatide, wie das Lecithin und seine Verwandten, sind seit langem bekannt, und ebenso phosphorhaltige Eiweißkörper, wie Casein und Vitellin. Diesen schließen sich die Nucleoproteide an, Verbindungen von eigentlichen Eiweißkörpern mit den phosporhaltigen Nucleinsäuren, in welch letzteren eine Kohlenhydrat-Phosphorsäure als Skelett vorhanden ist. Aus den Untersuchungen von Bang, Kossel, Levene, Neuberg und Steudel geht hervor, daß die Nucleinsäuren teils Verbindungen von Hexose, teils von Pentose mit Phosphorsäure enthalten und daß in ihnen dieser Kohlenhydratphosphorsäurerest mit stickstoffhaltigen Gruppen in ähnlicher Weise zu komplizierten Gebilden vereinigt ist, wie etwa die Glycerinphosphorsäure im Lecithin mit Cholin und Fettsäureradikalen. Bestimmten Gehirn- und Organlipoiden liegt ebenfalls eine Kohlenhydratphosphorsäure zugrunde, so dem Sphingomyelin von Thudichum, der Cerebrinphosphorsäure von A. Bethe und dem Carnaubon der Niere von E. K. Dunham und A. C. Jacobson[1]). Es

[1]) E. K. Dunham und A. C. Jacobson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 302, 1910

handelt sich in den letztgenannten Fällen um die d-Galaktosephosphorsäure. Während die bisher erwähnten Substanzen komplizierte Verbindungen der Phosphorsäure darstellen, liegt im Phytin ein einfaches Derivat vor. Diese früher als Formaldehyd-Phosphorsäureverbindung aufgefaßte Substanz ist vor einiger Zeit von C. Neuberg[1]) als Inositphosphorsäureester erkannt, der in zahlreichen Vegetabilien in Form seines Kalk- und Magnesiumsalzes recht verbreitet ist.

Seit vielen Jahren weiß man, daß dem in organischer Bindung vorhandenen Phosphor im intermediären Stoffwechsel der Tiere und Pflanzen eine bedeutsame Rolle zufällt. Erinnert sei nur an die phosphorhaltigen Albumosen und Peptone, z. B. an die Paranucleinsäure von E. Salkowski, die sogenannte Polypeptidphosphorsäure von F. A. Reh und die Caseonphosphorsäuren von M. Dietrich[2]). Auch der eigentümliche Vorgang der Labgerinnung scheint nach den Untersuchungen von W. Oertel[3]) mit dem Phosphorgehalt des Caseins im Zusammenhange zu stehen. Salze der einfachen Glycerinphosphorsäure treten im Stoffwechsel als Spaltungsprodukt des Lecithins und verwandter Phosphatide auf. Im Dasein der Hefe scheint die Phosphorsäure eine besondere, wenn auch im wesentlichen Punkte noch nicht durchsichtige Rolle zu spielen, wie in dem Umstande sich offenbart, daß die Hefe nach den Untersuchungen von Iwanow, Harden und Young, Lebedeff, Buchner und Antoni u. a. aus anorganischen Phosphaten und Zucker unter Umständen eine esterartige Verbindung zu synthetisieren vermag, die jetzt von C. Neuberg und Mitarbeitern mit Sicherheit als Fructosediphosphorsäure[4]) erkannt worden ist und deren Konstitution sich besonders auch daraus ergibt, daß sie auf rein chemischem Wege zur Fructosemonophosphorsäure abgebaut werden kann.

Die biologische Bedeutung der organischen Phosphorsubstanzen offenbart sich darin ebenfalls, daß weit verbreitet Fer-

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 9, 557, 1908.
[2]) M. Dietrich, diese Zeitschr. 22, 120, 1909.
[3]) W. Oertel, Dissertation. Berlin 1914.
[4]) C. Neuberg, E. Färber, A. Lewite und E. Schwenk, diese Zeitschr. 83, 244, 1917; 88, 432, 1918.

mente vorkommen, welche die Verarbeitung dieser Phosphorverbindungen besorgen, die sogenannten Phosphatasen. Eine solche ist ohne Zweifel tätig im Pankreassafte, da dieser aus den noch organische Phosphorsäureabkömmlinge enthaltenden peptischen Verdauungsprodukten anorganische Phosphorsäure frei macht: Diese Phosphatase — bzw. mehrere ähnliche Enzyme — sind wirksam sowohl gegen phosphorhaltige Albumosen und Peptone als gegen die Umwandlungsprodukte der Nucleoproteide; dementsprechend enthalten die Nucleasen gleichfalls eine Phosphatasekomponente. Überhaupt treten Phosphatasewirkungen bei vielen Abbauprozessen zutage, wie z. B. bei der Verdauung des Lecithins, wenn es auch nicht immer feststeht, ob es sich dabei um die Wirkung eines speziell Phosphorsäure ablösenden Fermentes handelt, oder ob die allgemeinen Esterasen die Hydrolyse von Phosphorsäureestern mit übernehmen. In pflanzlichen Organismen sind die dem Phosphorsäurestoffwechsel dienenden Fermente nicht weniger verbreitet, indem Glycerophosphatase[1]), Hefenphosphatase, Saccharophosphatase[2]), Phytase, Nuclease usw. wichtige Aufgaben erfüllen. Auch bei den autolytischen Vorgängen in Tier- und Pflanzenzellen spielt die Abspaltung von Phosphorsäure aus hochmolekularen organischen Phosphorsäureverbindungen eine unzweifelhafte Rolle.

Es entbehrt nun nicht des Interesses, ist bisher aber wenig beachtet, daß ein für die Ernährung des Menschen und im Stoffwechsel der Vegetabilien ungemein wichtiges Material, nämlich die Stärke, gleichfalls phosphorhaltig ist. Während ältere Phosphorbefunde an der Stärke auf ungenügende Reinigung, d. h. auf Beimengung anorganischer Phosphate, bezogen werden konnten, haben meines Wissens zuerst M. Samec und F. v. Hoefft[3]) auf Grund physikalisch-chemischer Methoden die Ansicht begründet, daß die Stärke eine esterartige Verbindung von Kohlenhydrat mit Phosphorsäure darstelle oder zum mindesten eine Amylophosphorsäure enthalte, indem von den Komponenten der Stärke das Amylopectin P-haltig, die Amylose phosphorfrei ist. Samecs Annahme

[1]) A. Nemec, diese Zeitschr. **93**, 94, 1919.

[2]) K. Djenab und C. Neuberg, diese Zeitschr. **82**, 391, 1917.

[3]) M. Samec und F. v. Hoefft, Chem. Centralbl. **13**, I, 632; **14**, I, 37; **14**, II, 719.

gründet sich im wesentlichen auf den Umstand, daß Stärkelösungen beim Stehen eine Zunahme der Leitfähigkeit aufweisen, was nach des Autors Meinung auf einer Hydrolyse von Stärkephosphorsäure beruht. Auch Änderungen der Viscosität und der kataphoretischen Eigenschaften, die Zunahme der Löslichkeit sowie des osmotischen Drucks würden mit einer solchen Voraussetzung sich in Übereinstimmung befinden. Die zugrunde liegende Amylophosphorsäure hat jedoch Samec nicht als solche dargestellt oder charakterisiert und ihre Existenz im wesentlichen auf indirektem Wege abgeleitet. Es muß noch hervorgehoben werden, daß frühere Versuche verschiedener Autoren (wie Ford, Fernbach, Malfitano, Fouard; Thomas, Gatin-Gruczewska) mit den Samecschen Auffassungen insofern im Einklange stehen, als es ihnen bei keiner der vielen angewendeten Reinigungsmethoden möglich war, wirklich phosphorsäurefreie Stärke zu gewinnen. Freilich ist der Phosphorsäuregehalt der natürlichen Stärke nur gering; immerhin ist er so groß, daß es in einer wichtigen Arbeit J. H. Northrop und J. M. Nelson[1]) gelungen ist, eine Kohlenhydratphosphorsäure durch gemäßigte Hydrolyse der Stärke zu gewinnen.

Das Verfahren der amerikanischen Autoren bestand darin, daß Stärke (10 kg) in Wasser (40 l) suspendiert und dann mit Salzsäure (2 l konz. HCl) versetzt wurde. Das Gemisch wurde dann kräftig gerührt und mit Dampf unter Druck bis zur Verflüssigung der zunächst gebildeten gelatinösen Masse behandelt. Die Lösung wurde alsdann im Vakuum eingeengt, mit Barytwasser neutralisiert, von dem entstandenen Niederschlag (Bariumphosphat, Stärke usw.) abfiltriert und mit Alkohol gefällt, wobei 60 g eines hygroskopischen Bariumsalzes (Rohprodukt) gewonnen wurden. Durch Überführung in die Bleiverbindung konnte daraus das Bleisalz der Kohlenhydratphosphorsäure und aus diesem durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff und Ausfällung mittels Eisessig auch die zugrunde liegende freie Säure selbst dargestellt werden. Letztere enthielt nach dem Auswaschen mit absolutem Alkohol 4,9% Phosphor ausschließlich in organischer Bindung. Sie war durch die Zusammensetzung und durch das fehlende Reduktionsvermögen gegenüber Fehlingscher Mischung noch als ein Derivat einer höheren Kohlenhydratmolekülverbindung gekennzeichnet. Durch wiederholte Reinigung über das Bleisalz und Ausfällung mit Alkohol wurde eine Säure gewonnen, die sogar 5,24 bis 5,55% Phosphor enthielt. Sie war vollkommen weiß, stark hygroskopisch und frei von verunreinigenden Aschebestandteilen sowie Stickstoff.

[1]) J. H. Northrop und J. M. Nelson, Journ. of the Americ. Chem. Soc. 38, 472, 1916.

An anderer Stelle ihrer Mitteilung geben jedoch die Verfasser an, daß die Substanz nach weitergetriebener Reinigung Fehlingsche Lösung reduziert habe. Die Verbindung zeigte eine spezifische Drehung, die mehr als doppelt so groß wie die von Traubenzucker war, nämlich $[\alpha]_D = +\ 108^0\ 30'$. Sie ergab bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren rund 65% eines Zuckers, der auf Grund des Drehungsvermögens seines Osazons im Pyridin-Alkohol-Gemisch nach Neuberg sich als Traubenzucker erwies. Die Analyse führte zu der Formel $C_{17}H_{31}O_{16}.PO_3H_2$. Trotz mancher Ähnlichkeit mit einer Maltosephosphorsäure waren Eigenschaften und Zusammensetzung jedoch mit einer solchen Annahme nicht zu vereinen. Die Natur der Substanz ist noch nicht aufgeklärt worden. Festgestellt ist nur, daß sie nicht durch ein Derivat des Inosits oder einer Pentose verunreinigt war; an letztere hätte man wegen der 17 C-Atome denken können.

Demnach steckt in der natürlichen Stärke offenbar ein Phosphorsäurekomplex. Aber die Aussicht erscheint bisher nicht groß, auf dem Wege des Abbaus zu einer reinen Kohlenhydratphosphorsäure zu gelangen, die einen Kern des Stärkemoleküls oder wenigstens eines Anteils desselben, des Amylopectins, bildet. Ich habe deshalb einen anderen Weg eingeschlagen, um eine Verbindung von Stärke mit Phosphorsäure kennen zu lernen, nämlich den der Steigerung des P-Gehaltes durch künstliche Einführung des Phosphorsäurerestes in die Stärke.

Zu diesem Zwecke benutzte ich die von Neuberg[1]) angegebene Methode der Phosphorylierung. Das Verfahren besteht darin, daß man die wäßrige Lösung des Kohlenhydrats bei Gegenwart eines säurebindenden Materials mit einer Lösung von Phosphoroxychlorid in alkoholfreiem Chloroform oder Äther schüttelt. Als Neutralisationsmittel wählt man zweckmäßig kohlensauren Kalk, weil dieser den Vorteil gewährt, den nicht in organische Bindung getretenen Teil des Phosphorylierungsmittels als unlösliches Calciumphosphat auszufällen, und die Möglichkeit bietet, das phosphorylierte Kohlenydrat selbst mit Alkohol niederzuschlagen, wobei das gleichzeitig entstandene Chlorcalcium als in Alkohol leicht lösliche Verbindung entfernt wird. Bei einem einfachen Zucker vollzieht sich die Reaktion nach der Gleichung:

$$2\ C_6H_{12}O_6 + 2\ POCl_3 + 5\ CaCO_3 = 5\ CO_2 + 3\ CaCl_2 + H_2O + 2\ C_6H_{11}O_5.O.PO_3Ca.$$

[1]) C. Neuberg und H. Pollak, diese Zeitschr. **23**, 515; **26**, 514 und 529, 1910; Ber. **43**, 2060, 1910; vgl. auch C. Neuberg und Kretschmer, diese Zeitschr. **36**, 5, 1911.

Die von E. Fischer[1]) vorgeschlagene Modifikation dieser Phosphorylierung gestattet eine bessere Ausnutzung des Phosphoroxychlorids durch Vornahme der Operation in wasserfreiem Pyridin; aber ihre Anwendbarkeit ist beschränkt auf die in Pyridin löslichen Zuckerarten, während die Stärke von diesem Solvens nicht aufgenommen wird. Das von K. Langheld[2]) angegebene Verfahren der P-Einführung mittels Metaphosphorsäureäthylesters kam gleichfalls nicht in Betracht, da es die Löslichkeit des Zuckers in metaphosphorsaurem Äthyl oder die Umwandlung des Kohlenhydrats in einen Sirup durch Schmelzen zur Voraussetzung hat.

Außerdem steht nach einer Reihe von Erfahrungen für das Neubergsche Verfahren fest, daß es die Anbringung der Phosphorsäure an solchen Stellen der zu phosphorylierenden Substanzen bewirkt, daß die Reaktionsprodukte eine physiologische Dignität aufweisen, wie in ihrem Verhalten gegenüber Fermenten zum Ausdruck kommt. So sind die nach Neuberg phosphorylierten Zuckerarten noch von den natürlichen Agenzien, den Phosphatasen, spaltbar sowie infolgedessen auch vergärbar, und die phosphorylierten Proteine und Albumosen bzw. Peptone werden noch von den Verdauungsfermenten zerlegt.

Zur

Darstellung der phosphorylierten Stärke

verfuhr ich folgendermaßen:

Versuch 1. 6 g lösliche Stärke (Kahlbaum) wurden in 150 ccm heißen Wassers gelöst. Die nach dem Erkalten leicht getrübte Flüssigkeit wurde sodann mit 24 g $CaCO_3$ versetzt; unter Eiskühlung sowie starkem Turbinieren wurde nunmehr tropfenweise eine Lösung von 5 ccm Phosphoroxychlorid in 10 ccm reinem Chloroform hinzugegeben. Nach 6- bis 8stündigem Rühren blieb die Flüssigkeit noch über Nacht stehen und wurde am anderen Morgen mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, zentrifugiert, außerdem filtriert und bei 35 bis 40° auf 50 ccm eingeengt. Diese Lösung wurde mit 150 ccm absoluten Alkohols versetzt, wobei sofort eine reichliche Fällung eintrat. Nach 24stündigem Absitzenlassen wurde dekantiert,

[1]) E. Fischer, Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wiss. **34**, 905, 1914; Ber. **47**, 3193, 1914.

[2]) K. Langheld, Ber. **43**, 1857, 1910; **45**, 3753, 1912.

mehrmals mit Alkohol gewaschen und abgesaugt. Da der Niederschlag sich noch als stark chlorhaltig erwies, wurde er in 50 ccm heißen Wassers wieder gelöst und abermals mit 150 ccm Alkohol gefällt. Die so erhaltene Substanz enthielt nur noch Spuren von Chlor (eingeschlossenes Chlorcalcium). Sie wurde über konzentrierter Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

Reaktionen der wäßrigen Lösung des Calciumsalzes von phosphorylierter Stärke: Die ganz leicht opalisierende wäßrige Lösung reagiert neutral gegen Phenolphthalein, schwach alkalisch gegen Lackmus; Magnesiamixtur gibt keine Fällung, ebensowenig Ammoniummolybdat, auch nicht beim Kochen der salpetersauren Lösung. Zerstört man jedoch die organische Bindungsform nach den Angaben von Neuberg und Mandel[1]) durch Abdampfen der Lösung mit einigen Kubikzentimetern Wasserstoffsuperoxyd sowie mehreren Tropfen starker Salpetersäure unter Zusatz einer Spur Eisennitrat, so erhält man kräftige Reaktionen auf anorganische Phosphorsäure. Das Vorliegen eines Calciumsalzes ergibt sich durch die Fällbarkeit mit Ammoniumoxalat in essigsaurer Lösung. Die Lösung zeigt die Jodreaktion wie reine Stärke[2]). Fehlingsche Mischung wird in der Siedehitze spurenhaft reduziert.

Zu den folgenden Darstellungsversuchen stand mir das sehr reine Kahlbaumsche Stärkepräparat leider nicht mehr zur Verfügung; ich verwendete eine lösliche Stärke von Merck, die einen kleinen Gehalt an Dextrin aufwies, aber trotzdem mit dem gleichen Erfolge phosphoryliert werden konnte. Hierbei wurden dem kohlensauren Kalk noch 10% Ätzkalk zur beschleunigten Abstumpfung der sauren Reaktion zugesetzt.

Versuch 2. 30 g lösliche Stärke wurden in 750 ccm heißen Wassers gelöst und nach dem Erkalten in gleicher Weise, wie bei 1. beschrieben, mit 25 g Phosphoroxychlorid in 75 ccm Chloroform behandelt. Die Flüssigkeit wurde nach Zentrifugieren und Filtrieren bei ca. 35° auf 100 ccm konzentriert[3]),

[1]) C. Neuberg und J. A. Mandel, diese Zeitschr. 71, 196, 1915.

[2]) Letztere war auch noch beigemischt.

[3]) Ein Einengen auf ein noch kleineres Volumen empfiehlt sich nicht, weil sonst unfiltrierbare schmierige Massen beim Zusatz des Alkohols ausfallen.

mit 300 ccm absolutem Alkohol gefällt und mehrmals umgelöst. Auf diese Weise wurden 15 g fast völlig chlorfreie Stärkephosphorsäure-Calciumverbindung erhalten.

1,1905 g Substanz wurde bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und im Platintiegel verascht. Die resultierenden 0,0864 g Asche ergaben

$$0{,}0400 \text{ g } CaO \text{ und } 0{,}0744 \text{ g } Mg_2P_2O_7,$$

entsprechend 0,0285 g Ca und 0,0207 g P.

$Ca_2P_2O_7$. Ber.: Ca = 31,50%, P = 24,41%;
gef.: Ca = 32,99%, P = 23,96%.

Gefunden auf Ausgangssubstanz:

$$Ca = 2{,}40\%, \quad P = 1{,}74\%;$$

theoretisch würde 1,74% P einem Quantum von 2,24% Ca entsprechen. Der etwas größere Gehalt an Calcium erklärt sich durch die geringe Menge eingeschlossenen Calciumchlorids, die auch bei häufig wiederholter Umfällung sich nicht vollständig entfernen ließ. Im übrigen folgt aus der Analyse das Vorliegen eines Monocalciumsalzes einer substituierten Phosphorsäure.

Das Bleisalz der Stärkephosphorsäure: 2,4 g lufttrockenes Calcium-Amylophosphat wurden mit einem kleinen Überschuß von Ammoniumoxalat behandelt und nach 24stündigem Stehen abfiltriert. Die klare Lösung wurde mit Bleiacetat versetzt, von der dadurch hervorgerufenen Fällung durch Filtration befreit und bei niederer Temperatur auf 10 ccm eingeengt, dann abermals filtriert und mit der 4fachen Menge abs. Alkohols gefällt. Nach 24stündigem Stehen wurde abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen. Die wäßrige Lösung der so erhaltenen Substanz gab positive Stärkereaktion und erwies sich als frei von anorganischer Phosphorsäure bei starkem Gehalte an organischem Phosphor. Zur weiteren Reinigung wurde das Salz nochmals in wenig heißem Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Auf diese Weise wurde 1 g exsiccatortrockene Bleiverbindung erhalten.

Analyse: Eine vollständige Zerstörung der organischen Substanz gelingt auch bei tagelangem Kochen mit rauchender Salpetersäure im Glasschliffkolben am Rückflußkühler schwer. Deshalb wurde der Körper unter Zusatz von Ammoniumnitrat

vorsichtig verascht. 0,3904 g der Bleiverbindung ergaben
0,0845 g $PbSO_4$ und 0,0305 g $Mg_2P_2O_7$,
entsprechend . . 0,0577 g Pb und 0,0085 g P;
$= 14{,}77\,\%$ Pb und $2{,}17\,\%$ P.
Theoretisch sind 0,0577 g Pb und 0,0086 g P äquivalent.

Ein Wort der Erklärung bedarf noch die Menge des bei der Bereitung angewendeten Phosphoroxychlorids. Sie ist so berechnet, als ob die in Arbeit genommene Stärkemenge der einfachen Formel $C_6H_{10}O_5$, und nicht einem polymolekularen Werte entspräche. Eine Erhöhung der Phosphoroxychloridmenge auf das Doppelte führte zu schwer filtrierbaren gelatinösen Massen, die viel Chlorcalcium einschlossen und nicht von anorganischen Beimengungen zu befreien waren. Von der Wiedergabe der diesbezüglichen Ansätze nehme ich daher Abstand.

Die Anwendung des Verfahrens auf die Stärke ergibt nun nicht wie bei den einfachen Zuckerarten einen Phosphorsäureester, der frei vom Ausgangsmaterial ist; denn durch Alkohol wird unveränderte Stärke zusammen mit dem phosphorylierten Reaktionsprodukte ausgefällt. Daß jedoch ein nicht unerheblicher Teil einer wirklichen Amylophosphorsäure in meinem Produkt enthalten war, folgt aus dem Verhalten beim Abbau.

1. Versuche zum Abbau mit Mineralsäuren.

a) 1 g Calciumamylophosphat wurde in 18 ccm Wasser gelöst und mit 2 ccm $25\,\%$iger Salzsäure versetzt. Nach 20 Minuten langem Stehen im Wasserbade ergaben sich starke Reduktion von Fehlingscher Mischung, negativer Ausfall der blauen Jodprobe und positive Reaktionen auf freie Phosphorsäure. Die Substanz war also schon weitgehend abgebaut und gespalten.

b) 1 g Substanz, in 100 ccm Wasser gelöst, wurde mit 1 ccm $25\,\%$iger Salzsäure versetzt und 48 Stunden bei 37^0 belassen. Die Stärkereaktion war noch stark positiv. Nach 3stündigem Erwärmen auf dem Wasserbade blieb die Jodprobe aus. Es zeigte sich mäßig starke Reduktion von Fehlingscher Mischung und deutliche Reaktion auf freie Phosphorsäure.

c) 5 g Calciumsalz wurden in 500 ccm Wasser unter Zusatz von 5 ccm $25\,\%$iger Salzsäure gelöst und auf dem Wasserbade erwärmt.

Nach 30 Minuten Stärkereaktion positiv,
„ $1^1/_2$ Stunden Stärkeabbau bis Dextrin,
„ 2 „ Dextrinreaktion,
„ 4 „ „ .

Die Flüssigkeit reduzierte Fehlingsche Mischung kaum. Sie wurde mit kohlensaurem Kalk neutralisiert, filtriert und bei 40° auf 10 ccm eingeengt, darauf mit Alkohol gefällt. Es schied sich ein schmieriges Produkt aus; auch Fällung in verdünnter Lösung lieferte kein besseres Resultat. Daher wurde der Alkohol im Vakuum abdestilliert und die übrig gebliebene Masse in Wasser gelöst. Mit Silberacetat wurde das Chlor quantitativ entfernt und die filtrierte Lösung bei niederer Temperatur wieder auf 10 ccm konzentriert. Nach Fällung mit Bleiessig wurde abgesaugt und der gut ausgewaschene Niederschlag nach sorgfältigem Verreiben mit Schwefelwasserstoff behandelt. Das Filtrat war stark sauer, zeigte sich frei von anorganischer Phosphorsäure bei starkem Gehalte an organisch gebundenem Phosphor. Fehlingsche Lösung wurde nur in geringem Grade reduziert.

In diesen Versuchen ist es nicht befriedigend gelungen, durch Hydrolyse mit verdünnten Mineralsäuren das Amylophosphat zu einer einfachen Zucker-Phosphorsäure abzubauen. Stärkere Säuren spalteten Phosphorsäure in beträchtlichem Maße ab.

2. Abbau durch Diastase.

Im Gegensatz zu den Abbauversuchen mit Mineralsäuren führte die fermentative Hydrolyse mittels Taka-Diastase zu einem wohldefinierten Produkt. Das zur Verwendung gelangende Enzympräparat war außerordentlich wirksam. Die in ihm vorhandene kleine Menge anorganischen Phosphats sowie reduzierenden Zuckers konnte vernachlässigt werden, da durch die spätere Verarbeitung diese Beimengungen in Fortfall kamen. Die Einwirkung der Diastase auf die phosphorylierte Stärke gestaltete sich dann folgendermaßen:

10 g stärkephosphorsaures Calcium wurden in 1 l Wasser gelöst, mit 3 g Diastase versetzt und in einen Brutschrank von 37° gestellt. Nach 24 Stunden war die Jodstärkereaktion verschwunden, Ostsche Kupferbicarbonatlösung wurde schwach

reduziert. Es wurde jetzt noch 1 g Diastase hinzugefügt und zur Konservierung 10 ccm Toluol hinzugegeben. Nach weiteren 12 Tagen wurde das Gemisch mit 6 g kohlensaurem Kalk 1 Stunde auf dem Wasserbade erwärmt, filtriert, bei 40° unter Zugabe von 0,3 g $CaCO_3$ auf 25 ccm eingeengt und mit absolutem Alkohol ausgefällt. Nach mehrmaliger Umlösung wurde abgesaugt und im Exsiccator getrocknet. Ausbeute: 1,2 g.

Analyse: 0,3023 g ergaben 0,1225 g Asche (Calciumpyrophosphat), die 0,0569 g CaO und 0,1032 g $Mg_2P_2O_7$ lieferte, entsprechend 0,0406 g Ca und 0,0288 g P. Der Wassergehalt ließ sich nicht direkt ermitteln, da Bräunung der Verbindung eintrat.

Für reines Glucosemonophosphat berechnet sich:

$C_6H_{11}O_5.PO_4Ca + H_2O$:

$Ca_2P_2O_7 = 40{,}19\,\%$; $Ca = 12{,}66\,\%$; $P = 9{,}81\,\%$;

gefunden: $Ca_2P_2O_7 = 40{,}52\,\%$; $Ca = 13{,}43\,\%$; $P = 9{,}54\,\%$.

Die Übereinstimmung ist befriedigend.

Die so erhaltene Substanz ist in heißem Wasser leicht und klar löslich, reagiert gegen Lackmus deutlich alkalisch, gegen Phenolphthalein neutral. Bleiessig fällt aus der wäßrigen Lösung einen dicken weißen Niederschlag, der in Essigsäure löslich und durch Ammoniak aus dieser Lösung wieder ausfällbar ist. Bleizucker gibt keinen Niederschlag, ebensowenig Kupfer- und Quecksilberacetat. Gesättigtes Barytwasser erzeugt eine weiße flockige Ausscheidung, entsprechend verhält sich Chlorbarium und Ammoniak. Chlorcalcium und Ammoniak geben eine unvollständigere Fällung. Die Substanz ist rechtsdrehend, die 25%ige Lösung dreht + 0,35° im 2-dm-Rohr. Mit Hefe (obergäriger, Rasse M) tritt langsam Gärung ein. Offenbar wird erst die Phosphorsäure losgelöst. 0,25 g Substanz in 20 ccm H_2O gaben mit 1 g Hefe nach 5 Stunden noch kein Gas, nach 22 Stunden aber 12 ccm CO_2 und nach 46 Stunden 17,5 ccm. Durch Selbstgärung von 1 g Hefe mit 20 ccm Wasser entstanden in der gleichen Zeit im ganzen 0,2 ccm CO_2. In 0,75%iger Zuckerlösung bewirkte die Hefe normale Gärung.

Es mag hervorgehoben werden, daß die beim diastatischen Abbau des Amylophosphats erhaltene einfache Kohlenhydratphosphorsäureverbindung als Hexosemonophosphat sich erwiesen hat und nicht als Maltoseabkömmling, obgleich doch die meisten Diastasesorten an sich aus Stärke vorwiegend Malzzucker, aber

weniger Glucose erzeugen. Es ist wohl anzunehmen, daß durch die Einführung des Phosphorsäurerestes Änderungen im Stärkemolekül eintreten, die diese Abweichung zur Folge haben können.

Zum Schlusse sei noch bemerkt, daß sich dasselbe Verfahren auf zwei wichtige, der Stärke nahestehende, natürlich vorkommende Polysaccharide anwenden läßt, auf das Inulin sowie auf das Glykogen. In beiden Fällen konnte der Phosphorsäureester dieser Kohlenhydrate auf dem gleichen Wege isoliert werden; beide Male gelang die Darstellung von Substanzen, die frei von Chlorcalcium und anderen anorganischen Begleitstoffen waren. Die genaue Untersuchung mußte jedoch wegen der schwierigen Materialbeschaffung während des Krieges unterbleiben; sie soll aber ebenso wie die Beschäftigung mit der synthetischen Stärkephosphorsäure fortgesetzt werden.

Zusammenfassung.

Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß die im Haushalte der Natur so außerordentlich wichtige Stärke Phosphor in organischer Bindung enthält, und zwar in Gestalt eines Kohlenhydratphosphorsäureesters. Die Herausschälung einer einheitlichen Kohlenhydratphosphorsäure aus der natürlichen Stärke ist bisher nicht gelungen. Um die Eigenschaften einer solchen Amylophosphorsäure kennen zu lernen, habe ich die künstliche Anreicherung der Stärke an Phosphor durch Phosphorylierung nach dem Neubergschen Verfahren ausgeführt. Die in Form des Kalksalzes näher untersuchte Stärkephosphorsäureverbindung konnte durch diastatischen Abbau in Hexosemonophosphorsäure übergeführt werden, die ebenfalls als Kalksalz abgeschieden, in analysenreinem Zustande erhalten worden und durch Hefe vergärbar befunden ist.

Der erste Teil der Arbeit:
Über den Verlauf der alkoholischen Gärung bei Gegenwart von Kohlensaurem Kalk, ist in den Berichten der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 52. Jahrgang, Seite 1753 uff. erschienen.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1917, 1918 und 1919 in der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie angefertigt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Direktor des Instituts, Herrn Geheimen Medizinalrat Professor Dr. v. Wassermann für das mir stets bewiesene Interesse und Entgegenkommen meinen verbindlichen Dank auszusprechen. Herrn Professor Dr. Neuberg, der mich zu dieser Arbeit veranlaßte und mir stets mit seinem Rat aufs liebenswürdigste zur Seite stand, möchte ich auch an dieser Stelle meine dauernde Dankbarkeit bezeugen.

Lebenslauf

Johannes Wolfgang Kerb, Sohn des Fabrikbesitzers und Handelsrichters Robert Kerb, wurde ich am 24. Juni 1884 zu Berlin geboren und bin evangelisch und Preuße.

Ich bestand Ostern 1903 am Friedrichsrealgymnasium meiner Vaterstadt die Reifeprüfung und widmete mich dann zunächst dem Studium der Chemie. Ich studierte an den Universitäten: Heidelberg, Berlin, München und Freiburg i. Br. Im Juli 1907 bestand ich an der Universität Freiburg i. Br. das philosophische Doktorexamen und promovierte mit einer Dissertation: „Zur Kenntnis aromatischer Ketone." 1907—1908 genügte ich meiner Dienstpflicht als Einjährig-Freiwilliger. Von Oktober 1908 bis 1909 war ich bei Professor Bredig in Heidelberg mit physikalisch-chemischen Studien beschäftigt. Vom Herbst 1909 bis zum Frühjahr 1911 war ich am I. chemischen Institut der Universität Berlin in Gemeinschaft mit Professor Diels mit wissenschaftlichen Untersuchungen beschäftigt. Ich kam dann als Assistent an die ernährungsphysiologische Abteilung des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin und von dort im Winter des gleichen Jahres an die chemische Abteilung des tierphysiologischen Instituts der Landwirtschaftlichen Hochschule, wo ich bis Ostern 1913 blieb. Seit dem Sommersemester 1912 widmete ich mich dem Studium der Medizin. Ostern 1913 setzte ich das Studium in Freiburg i. Br. fort, woselbst ich im Wintersemester 1913/14 die ärztliche Vorprüfung bestand und im Sommersemester 1914 wieder nach Berlin zurückkehrte. Am 11. August 1914 — ich war inzwischen krankheitshalber aus dem Heere ausgeschieden — trat ich als Kriegsfreiwilliger in den Heeresdienst, in welchem ich teils im Felde, teils in der Heimat bis zum 31. Dezember 1918 verblieb. Im Winter 1914/15 hatte ich während eines Kommandos an die Charité Gelegenheit, meine klinischen Studien fortzusetzen und im Sommer 1917, als ich an das Kaiser Wilhelm-Institut für physikalische Chemie (Gasschutzabteilung) kommandiert war, konnte ich dieselben zum Abschluß bringen. August und September 1917 legte ich dann die ärztliche Staatsprüfung ab und erhielt mit Gültigkeit vom 1. April 1918 die Approbation als Arzt.

Im Sommer 1917 hatte ich im Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie auf Veranlassung von Herrn Professor Neuberg meine Untersuchungen zur Kenntnis der Kohlenhydrate begonnen, konnte dieselben aber erst nach meiner Demobilmachung Januar bis April 1919 vollenden.

Ich besuchte die Vorlesungen bezw. Übungen der Herren Professoren: v. Baeyer†, v. Berenberg-Goßler†, Bonnhoeffer, v. Bardeleben, Bredig, Brugsch, Bumm, Brückner, Curtius, Czerny, Doflein, Emil Fischer†, Fleischmann, Franz, Gattermann, Graeff, Hertwig, Himstedt, Jahn, Keibel, Klapp, Königsberger, Köhler, v. Kries, Landolt†, Marckwald, Georg Meyer, Oltmanns, Osaun, Quincke, Rosin, Schäfer, v. Waldeyer-Hartz, Warburg, Wiedersheim.

Ich bin mit Dr. phil. Elisabeth Kerb, geb. Etzdorf verheiratet.